УДК 577.218 DOI: 10.15372/SSMJ20180301

ПОИСК РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ARE В ГЕНАХ ОСНОВНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ АУТОФАГИИ И ЛИЗОСОМАЛЬНОГО БИОГЕНЕЗА TFEB И TFE3

Антон Владимирович ЧЕЧУШКОВ, Елена Брониславовна МЕНЬЩИКОВА

НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Главные регуляторы лизосомального биогенеза и аутофагии транскрипционные факторы TFEB и TFE3 контролируют большинство генов белков, участвующих в формировании лизосом, посредством взаимодействия с промоторами этих генов, содержащих регуляторный мотив CLEAR. Их активация строго регулируема и происходит в ответ на нарушение лизосомального гомеостаза и повреждающие воздействия на клетки. Подобные воздействия сопровождаются активацией редокс-процессов и индукцией редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE, главным назначением которой является поддержание внутреннего гомеостаза при апоптоз-индуцирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях. Таким образом, возникает вопрос о наличии регуляторных связей между сигнальными системами Keap1/Nrf2/ARE и TFEB(TFE3)/CLEAR. Для поиска последовательности ARE в генах *TFEB* и *TFE3* была сформирована позиционная матрица на основании описанных в литературе 57 функциональных последовательностей ARE. ARE-подобные последовательности были маркированы в геномном браузере UCSC для анализа эволюционной консервативности, солокализации с различными функциональными модификациями ДНК и хроматина, а также с другими регуляторными элементами. В гене *TFEB* человека обнаружено 15 ARE-подобных мотивов. Из них последовательность, расположенная в первом интроне, является консервативной среди позвоночных животных. В гене *Tfeb* мыши также обнаружено 15 ARE-подобных мотивов, один из которых является консервативным, но располагается в экзоне на кодирующей стороне. Гены транскрипционного фактора TFE3 человека и мыши содержат меньше ARE-подобных последовательностей, среди них обращает на себя внимание консервативная среди позвоночных последовательность, расположенная во втором интроне. На основании данных ChIP-seq базы ENCODE проанализирован гистоновый ландшафт в соответствующих областях генома и установлено, что, вероятно, эволюционно консервативный регуляторный элемент ARE, расположенный в энхансерной области гена *TFE3*, играет функциональную роль.

Ключевые слова: система Keap1/Nrf2/ARE, лизосомальный биогенез, аутофагия, TFEB, TFE3.

Центральным регулятором свободнорадикальных процессов является фактор транскрипции Nrf2 (nuclear E2-related factor 2), контролирующий экспрессию генов, содержащих в своих промоторах антиоксидант-респонсивный элемент ARE (antioxidant respons(iv)e element, 5′-A/GTGA(C/T)nnnGCA/G-3′). В клетках Nrf2 находится под постоянным контролем репрессорного белка Keap1 (Kelch-like ECH associating protein 1), являющегося своеобразным молекулярным «сенсором» изменения внутриклеточного гомеостаза. Неразрывная связь этих молекулярных структур позволяет объединить их в единую редокс-чувствительную сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE, главным назначением которой является поддержание внутреннего гомеостаза при апоптоз-индуцирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях [1, 6]. ARE контролирует экспрессию более 500 генов, среди которых можно выделить следующие группы: кодирующие ферменты II фазы метаболизма ксенобиотиков, кодирующие антиоксидантные ферменты и кодирующие белки, которые координируют устранение последствий окислительного стресса, в частности, относящиеся к убиквитин-протеасомной системе, аутофагии и биогенезу митохондрий [2, 5, 7, 8, 14].

В настоящее время все больше внимания уделяется регуляторной связи аутофагии и сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE. Обе эти системы

Чечушков А.В. *– научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: achechushkov@gmail.com*
Меньщикова Е.Б. *– д.м.н., зав. лабораторией молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: lemen@centercem.ru*

по отдельности рассматриваются различными коллективами авторов в контексте патогенеза нейродегенеративных заболеваний. В последнее время началось накопление сведений о том, что Kea1/Nrf2/ARE участвует в контроле генов селективной аутофагии (например, генов белков p62/SQSTM, NDP52 и Parkin1). С другой стороны, недавно был описан механизм индукции Keap1/Nrf2/ARE, обусловленный не окислением белка Keap1, а его связыванием с белком p62/SQSTM с образованием агрегатов Keap1/p62, что в свою очередь увеличивает активность Nrf2 [8].

Одновременное увеличение экспрессии гена p62/SQSTM, опосредуемое активностью Nrf2, дополнительно повышает интенсивность связывания Keap1, что образует петлю положительной обратной связи в механизме активации Nrf2. Лимитирующую функцию в этом механизме (негативная обратная связь) выполняет аутофагия, удаляя агрегаты белка p62, таким образом предотвращая дальнейшее связывание Keap1. В то же время закономерности этого процесса изучены плохо. Влияние же Nrf2 на данную сторону процесса до сих пор не описано. Мы считаем, что такое влияние вполне вероятно, принимая во внимание стимуляцию аутофагии активными формами кислорода, окисляющими цистеиновые остатки белков-эффекторов аутофагии, а также существенное влияние активности аутофагии на их генерацию клетками.

Изучая возможные белки-регуляторы аутофагии, мы обратили внимание на главные регуляторы лизосомального биогенеза и аутофагии – транскрипционные факторы TFEB и TFE3, которые контролируют большинство генов белков, участвующих в формировании лизосом, а также ликвидации содержимого аутофагосом. Их активация строго регулируема и происходит в ответ на нарушение лизосомального гомеостаза и повреждающие воздействия на клетки. При анализе структур генов этих белков нами были обнаружены ARE-подобные элементы, которые могут иметь регуляторное влияние на их активность.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для установления возможности обнаружить регуляторные связи между сигнальными системами Keap1/Nrf2/ARE и TFEB(TFE3)/CLEAR мы проверили наличие элементов ARE в генах транскрипционных факторов TFEB и TFE3 человека и мыши. Для поиска последовательности ARE в интересующих генах была сформирована позиционная матрица (Position Frequency Matrix) на основании описанных в литературе 57 функциональных последовательностей ARE, которые были обнаружены экспериментальными методами, исследующими взаимодействие ДНК и белка (анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA), ДНКаза-футпринтинг, генные конструкции «промотор – репортер») [16]. Обнаружение последовательности проводилось с помощью программного пакета RSAT [4, 13].

На предмет наличия ARE-подобных элементов были проанализированы последовательности генов *TFEB* и *TFE3* человека и мыши (последовательности взяты из GenBank). Для анализа использовали последовательности с добавлением по 5000 пар нуклеотидов до и после окончания рамок считывания гена. Полученные ARE-подобные последовательности были маркированы в геномном браузере UCSC для анализа эволюционной консервативности, солокализации с различными функциональными модификациями ДНК и хроматина, а также с другими регуляторными элементами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для контроля качества собранная позиционная матрица была проверена на нуклеотидной последовательности гена *Mafg* мыши, в котором локализован мотив ARE с экспериментально подтвержденной функциональной значимостью [3, 10]. Выявлена соответствующая описанной в литературе последовательность TCATGCTGACTCAGCGGATCG с уровнем значимости $1{,}4 \times 10^{-6}$.

В гене *TFEB* человека обнаружено 15 ARE-подобных мотивов. Из них последовательность (условно обозначенная нами как ARE_tfeb), расположенная в первом интроне, является консервативной среди позвоночных животных. В гене *Tfeb* мыши также обнаружено 15 ARE-подобных мотивов (рис. 1). Один из них является консервативным, но располагается в экзоне на кодирующей стороне. Таким образом, консервативность данной последовательности может быть связана с консервативностью структуры белка. Еще одна высококонсервативная последовательность расположена в первом интроне и совпадает с аналогичной последовательностью человека.

Таким образом, последовательность ARE_tfeb представляет наибольший интерес, так как располагается в некодирующей части гена *TFEB* и является высококонсервативной. В литературе до настоящего момента наличие подобной регуляторной последовательности не описано.

Гены транскрипционного фактора TFE3 человека и мыши содержат меньше ARE-подобных последовательностей (рис. 2). Среди них обращает на себя внимание консервативная среди

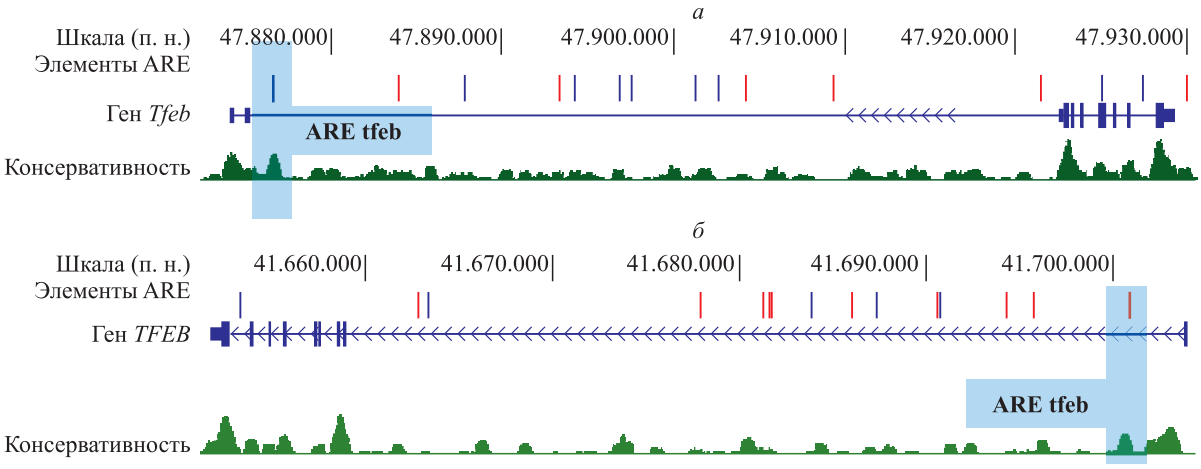

Рис. 1. *Локализация последовательностей ARE в области гена Tfeb мыши (а) и человека (б). Гистограмма характеризует уровень консервативности соответствующих последовательностей среди позвоночных животных (получены с помощью инструмента PhastCons)*

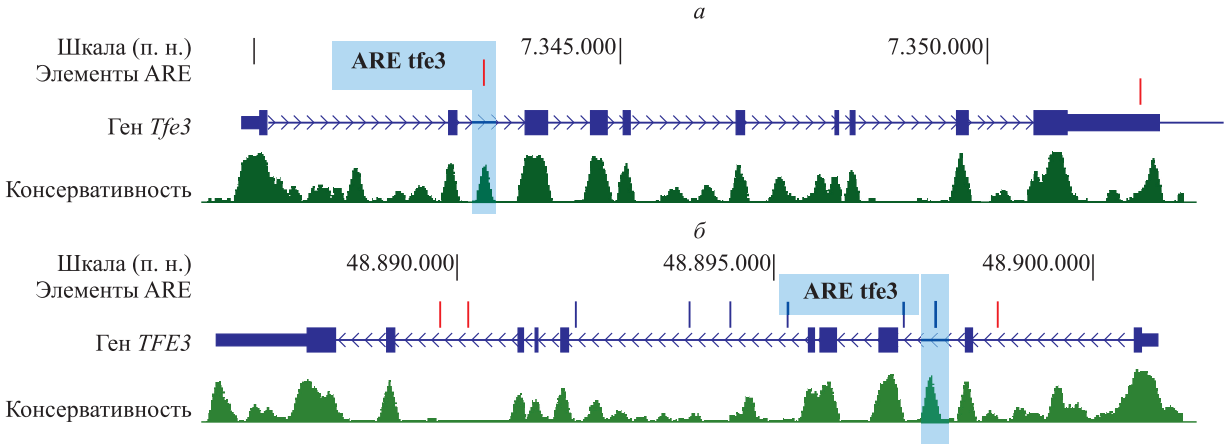

Рис. 2. *Локализация ARE в области гена Tfe3 мыши (а) и человека (б). Гистограмма характеризует уровень консервативности соответствующих последовательностей среди позвоночных животных (получены с помощью инструмента PhastCons)*

позвоночных последовательность, расположенная во втором интроне и обозначенная нами как ARE_tfe3.

Для понимания функциональной роли последовательностей ARE_tfeb и ARE_tfe3 на основании данных ChIP-seq базы ENCODE [15] был проанализирован гистоновый ландшафт в соответствующих областях генома. Участок локализации последовательности ARE_tfeb характеризуется высокой частотой триметилирования H3K3me3 и, следовательно, может быть отнесен к промоторной области гена. В то же время анализ данных о связывании с данной областью гена транскрипционных факторов семейства NFE2 (к которому принадлежит и Nrf2), а также других белков (Bach1 и MAF), взаимодействующих с мотивом ARE, не обнаруживает сигнала локализации этих транскрипционных факторов. Таким образом, очевидно, что данная ARE-последовательность не играет функциональной роли, а консервативность этой области генома связана с большой плотностью регуляторных элементов для других транскрипционных факторов, необходимых для регуляции экспрессии гена, кодирующего TFEB.

Аналогичный анализ гистоновых модификаций для области локализации мотива ARE_tfe3 обнаруживает высокую частоту ацетилирования лизина 27 гистона H3 (модификация H3K27Ac) и метилирования лизина 4 гистона H3 (H3K4Me1), фланкирующих указанную регуляторную область, что характерно для энхансерных областей генов [12] (рис. 3). В то же время для данного мотива характерно связывание транскрипционных факторов Bach1, MAF и NFE, а также белков, взаимодействующих с Nrf2: JunD, FOSL2, FOS.

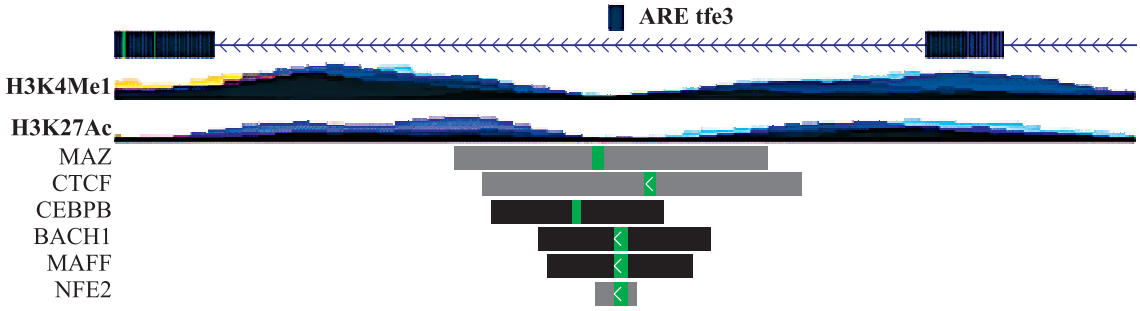

Рис. 3. *Гистоновые модификации (H3K4Me1 и H3K27Ac) областей связывания различных транскрипционных факторов в области ARE_tfe3*

Кроме того, рядом с мотивом ARE_Tfe3 располагаются мотивы связывания транскрипционных факторов CEBPB, CTCF и MAZ, локализация которых также является консервативной. Поэтому можно предположить, что в регуляции активности гена *TFE3* играет роль весь комплекс указанных регуляторных мотивов.

Регуляторные элементы генов зачастую являются частью мобильных элементов, и потому могут встраиваться или удаляться в различных участках генома относительно быстро в масштабах времени биологической эволюции. В то же время удаление функционально значимых последовательностей может сопровождаться существенными нарушениями функционирования гена и патологиями организма, поэтому такие участки являются консервативными среди близкородственных групп животных [9, 11].

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что для генов тесно взаимосвязанных транскрипционных факторов TFEB и TFE3 характерно наличие в некодирующих участках большого количества ARE-подобных последовательностей. Положение большей части из них не сохраняется в филогенетическом ряду и они, вероятно, не играют функциональной роли (хотя это утверждение носит умозрительный характер). Наибольшей значимостью обладают ARE-подобные элементы, для которых характерна эволюционная консервативность как положения относительно других регуляторных элементов и структуры гена, так и последовательности нуклеотидов. Важной особенностью обнаруженных ARE-подобных элементов является сохранение в них консенсусного ядра мотива TGAcnnnGC, указывая на то, что они действительно могут быть отнесены к элементам типа ARE. При этом отсутствие консервации для большинства из обнаруженных последовательностей, вероятно, связано с их низкой функциональной значимостью или отсутствием таковой.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б.* Лабиринты регуляции Nrf2 // Биохимия. 2017. 82. (5). 757–767.

2. *Bellezza I., Giambanco I., Minelli A., Donato R.* Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress // Biochim. Biophys. Acta. 2018. 1865. (5). 721–733.

3. *Cheng Q., Kalabus J.L., Zhang J., Blanco J.G.* A conserved antioxidant response element (ARE) in the promoter of human carbonyl reductase 3 (CBR3) mediates induction by the master redox switch Nrf2 // Biochem. Pharmacol. 2012. 83. (1). 139–148.

4. *Defrance M., Janky R., Sand O., van Helden J.* Using RSAT oligo-analysis and dyad-analysis tools to discover regulatory signals in nucleic sequences // Nat. Protoc. 2008. 3. (10). 1589–1603.

5. *Dikic I.* Proteasomal and autophagic degradation systems // Annu. Rev. Biochem. 2017. 86. 193–224.

6. *Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T.* The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism // Trends Biochem. Sci. 2014. 39. (4). 199–218.

7. *Holmstrom K.M., Kostov R.V., Dinkova-Kostova A.T.* The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function // Curr. Opin. Toxicol. 2016. 1. 80–91.

8. *Liu W.J., Ye L., Huang W.F., Guo L.J., Xu Z.G., Wu H.L., Yang C., Liu H.F.* p62 links the autophagy pathway and the ubiqutin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation // Cell. Mol. Biol. Lett. 2016. 21. 29.

9. *Lowdon R.F., Jang H.S., Wang T.* Evolution of epigenetic regulation in vertebrate genomes // Trends Genet. 2016. 32. (5). 269–283.

10. *Nerland D.E.* The antioxidant/electrophile response element motif // Drug Metab. Rev. 2007. 39. (1). 235–248.

11. *Pearson R.G.* Reasons to conserve vature // Trends Ecol. Evol. 2016. 31. (5). 366–371.

12. *Pennacchio L.A., Bickmore W., Dean A., Nobrega M.A., Bejerano G.* Enhancers: five essential questions // Nat. Rev. Genet. 2013. 14. (4). 288–295.

13. *Sand O., Thomas-Chollier M., Vervisch E., van Helden J.* Analyzing multiple data sets by interconnecting RSAT programs via SOAP Web services: an example with ChIP-chip data // Nat. Protoc. 2008. 3. (10). 1604–1615.

14. *Vomund S., Schafer A., Parnham M.J., Brune B., von Knethen A.* Nrf2, the master regulator of antioxidative responses // Int. J. Mol. Sci. 2017. 18. (12).

15. *Wang J., Zhuang J., Iyer S., Lin X.Y., Greven M.C., Kim B.H., Moore J., Pierce B.G., Dong X., Virgil D., Birney E., Hung J.H., Weng Z.* Factorbook.org: a Wiki-based database for transcription factor-binding data generated by the ENCODE consortium // Nucleic Acids Res. 2013. 41. (Database issue). D171–D176.

16. *Wang X., Tomso D.J., Chorley B.N., Cho H.Y., Cheung V.G., Kleeberger S.R., Bell D.A.* Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome // Hum. Mol. Genet. 2007. 16. (10). 1188–1200.

SEARCH FOR ARE REGULATORY SEQUENCES IN GENES OF MASTER REGULATORS OF AUTOPHAGY AND LYSOSOMAL BIOGENESIS TFEB AND TFE3

Anton Vladimirovich CHECHUSHKOV, Elena Bronislavovna MENSHCHIKOVA

Research Institute for Experimental and Clinical Medicine of Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

Transcription factors TFEB and TFE3 are the master regulators of lysosomal biogenesis and autophagy and control most of the protein genes involved in the formation of lysosomes by interacting with the promoters of these genes containing the regulatory motif CLEAR. Their activation is strictly regulated and occurs in response to the violation of lysosomal homeostasis and cell damage. Such effects are accompanied by activation of redox processes and by induction of the redox-sensitive signal system Keap1/Nrf2/ARE, the main purpose of which is to maintain internal homeostasis in apoptosis-inducing, carcinogenic and stressful influences. Thus, the question arises about the existence of regulatory loops between the Keap1/Nrf2/ARE and TFEB(TFE3)/CLEAR signaling systems. To search for the ARE sequence in the TFEB and TFE3 genes, a position frequency matrix was generated based on the 57 functional ARE sequences described in the literature. ARE-like sequences were labeled in the UCSC genome browser for analysis of evolutionary conservation, colocalization with various functional DNA and chromatin modifications, as well as with other regulatory elements. In the human *TFEB* gene, 15 ARE-like motifs were found. Of these, the sequence located in the first intron is conserved across vertebrates. In the mouse *Tfeb* gene, 15 ARE-like motifs were also found; one of them is conserved, but is located in the coding exon. Human and mouse transcription factor TFE3 genes contain less ARE-like sequences, among them the sequence conserved across vertebrate is noteworthy, which is located in the second intron. Using the ChIP-seq data from the ENCODE database, the histone landscape in the respective regions of the genome was analyzed and it was established that the evolutionarily conserved ARE regulatory element located in the *TFE3* enhancer region likely play a functional role.

Key words: Keap1/Nrf2/ARE system, lysosomal biogenesis, autophagy, TFEB, TFE3.

Chechushkov A.V. *– researcher of laboratory of molecular mechanisms of free radical processes, e-mail: achechushkov@gmail.com*
Menshchikova E.B. *– doctor of medical sciences, head of the laboratory of molecular mechanisms of free radical processes, e-mail: lemen@centercem.ru*